

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-255484

(43)Date of publication of application : 09.10.1995

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
// (C12N 15/09
C12R 1:01)

(21)Application number : 06-073795

(71)Applicant : JAPAN ENERGY CORP

(22)Date of filing : 22.03.1994

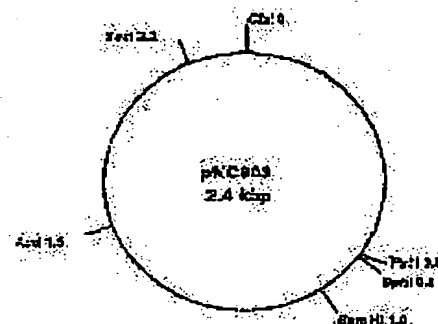
(72)Inventor : SAEKI HISAFUMI

(54) PLASMID PNC903

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a cyclic plasmid pNC903 effective for the modification with an exogenic DNA fragment introduced into the plasmid by taking advantage of the cutting sites with various restriction enzymes, utilisable for the development of various useful plasmid vectors and especially useful as a plasmid vector of a host-vector system using *Nocardia form* bacteria as a host.

CONSTITUTION: This plasmid pNC903 is a cyclic plasmid having a molecular weight of about 2.4kb, resistant to cutting with restriction enzymes *EcoRI*, *XbaI*, *KpnI*, *HindIII*, *BglII* or *SpeI* and containing one each cutting site with restriction enzymes *Clal*, *PstI*, *SphI*, *BamHI*, *AclI* and *SacI* shown in the restriction map.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-255484

(43) 公開日 平成7年(1995)10月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
// (C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:01)				
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求 請求項の数 2	F D (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-73795

(22) 出願日 平成6年(1994)3月22日

(71) 出願人 000231109

株式会社ジャパンエナジー

東京都港区虎ノ門二丁目10番1号

(72) 発明者 佐伯 尚史

埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式会社ジャパンエナジー内

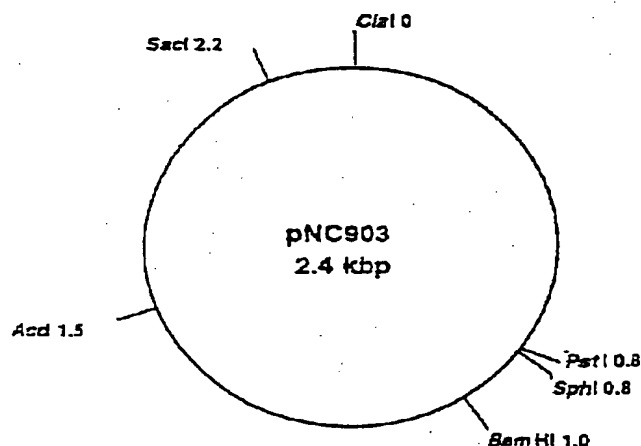
(74) 代理人 弁理士 並川 啓志

(54) 【発明の名称】 プラスミド pNC903

(57) 【要約】

【構成】 分子量が約2.4kbの環状プラスミドであり、制限酵素 EcoRI、XbaI、KpnI、HindIII、BglII、又は SpeI によって切断されず、制限酵素 ClaI、PstI、SphI、BamHI、AccI、及び SacI によって切断される部位数がそれぞれ1であり、且つ前記の制限酵素 ClaI、PstI、SphI、BamHI、AccI、及び SacI によって切断される部位が図1の制限酵素開裂地図で示されるプラスミドpNC903。

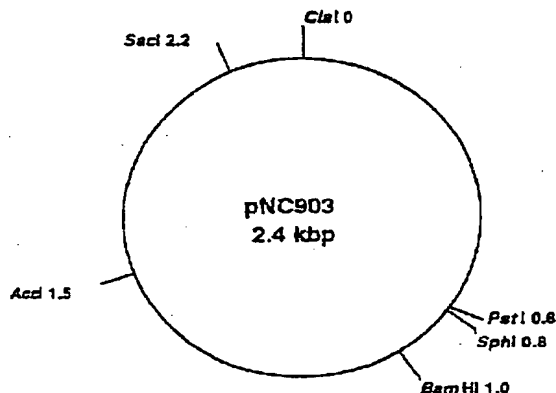
【効果】 環状プラスミドpNC903は、それに含まれる種々の制限酵素による開裂部位を利用して、外来のDNA断片を導入修飾し、多くの有用なプラスミドベクターの開発に利用でき、特に、ノカルディオフォルム細菌を宿主とする宿主ベクター系におけるプラスミドベクターとして有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 分子量が約2.4kbの環状プラスミドであり、制限酵素 *EcoRI*、*XbaI*、*KpnI*、*HindIII*、*BglI*、又は *SpeI* によって切断されず、制限酵素 *Clal*、*PstI*、*SphI*、*BamHI*、*AccI*、及び *SacI* によって切断される部位数がそれぞれ1であり、且つ前記の制限酵素 *Clal*、*PstI*、*SphI*、*BamHI*、*AccI*、及び *SacI* によって切断される部位が下記の制限酵素開裂地図化1で示されるプラスミドpNC903。

【化1】



【請求項2】 該環状プラスミドが、*Rhodococcus rhodochrous* P-11-123-1(工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号 FERM P-14193) 由来のプラスミドであることを特徴とする請求項1に記載のプラスミドpNC903。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なプラスミドに関し、具体的には、エポキシド生産菌である *Rhodococcus* 属に属する微生物に由来する新規な環状プラスミドに関する。本発明の環状プラスミドは、それに含まれる制限酵素によって切断される部位を利用して、両端に当該制限酵素によって切断されるDNA配列を有するDNA断片を連結してなる人工の環状プラスミドの調製に用いることができる。

【0002】

【従来の技術】 短鎖長オレフィン炭素源として、土壤中より分離したノカルディア属、ロドコッカス属といったノカルディオフォルム細菌はオレフィンを酸化して、対応するエポキシド類を生産することが知られている。例えば、プロピレン炭素源として土壤中より分離したノカルディア・コラリーナは、光学活性なエポキシドや、合成樹脂、医薬、農薬などの有機化学製品の製造原料中間体として広範囲に利用できるトリフルオロプロペンオキシド (TFPO) の生産などに利用されている。これらの土壤中より分離したノカルディオフォルム細菌を用い、更なる菌株改良のため、エポキシド生産能を有する

ノカルディオフォルム細菌の宿主ベクター系の開発が以前から期待されていた。これらの微生物を宿主とするに適したベクター開発は遅れているが、本発明者は、既にエポキシド生産株のノカルディア・コラリーナより、ノカルディオフォルム細菌の宿主ベクター系に適用可能なプラスミドpNC500を見だし、特許出願した(特開平5-244953号公報を参照)。また、ロドコッカス属の一部を宿主とする、宿主ベクター系の開発例として、ジャーナル オブ バクテリオロジー(J.Bacteriol.) 170, 638(1988)、アプライドアンド エンバイロメンタル マイクロバイオロジー(Appl. Environ. Microbiol.) 56, 2818(1990)、プラスミド (Plasmid) 23, 242(1990) 等の数例が報告されている。

【0003】 しかしながら、前記するプラスミドpNC500を除き、従来より報告されているノカルディオフォルム細菌由来のプラスミドの多くは、ロドコッカス属の一部のみを宿主にするにすぎないものであった。そのため、より広い範囲のノカルディオフォルム細菌を宿主として適用でき、宿主のエポキシド生産菌から、微生物を育種、改良するための新しいベクターの開発が強く要望されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は上記の課題を解決するもので、本発明の目的は、ノカルディオフォルム細菌を宿主として、ノカルディオフォルム細菌において複写が可能である新規な環状プラスミドを提供することにある。特に、ノカルディオフォルム細菌に類別されるロドコッカス属に属する微生物に由来する新規な環状プラスミドDNAを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、ノカルディオフォルム細菌を宿主とでき、DNA組換えに使用可能な新規なプラスミドDNAを開発すべく鋭意研究を行ったところ、当該細菌に類別され、エポキシド生産菌であるロドコッカス属に属する微生物から、宿主ベクター系におけるベクターとして利用可能な新規な環状プラスミドを見出し、本発明を完成した。

【0006】 本発明のプラスミドは、分子量が約2.4 kbの環状プラスミドであり、制限酵素 *EcoRI*、*XbaI*、*KpnI*、*HindIII*、*BglI*、又は *SpeI* によって切断されず、制限酵素 *Clal*、*PstI*、*SphI*、*BamHI*、*AccI*、及び *SacI* によって切断される部位数がそれぞれ1であり、且つ前記の制限酵素 *Clal*、*PstI*、*SphI*、*BamHI*、*AccI*、及び *SacI* によって切断される部位が下記の制限酵素開裂地図化1で示されるプラスミドであり、該プラスミドにプラスミドpNC903の呼称を本発明者は付与する。

【化1】

【0007】 本発明のプラスミドpNC903を保有する微生物として、具体的にロドコッカス属に属する微生物であ

り、プロピレン資化性菌として土壌から分離した、エボキシド生産能を有する菌株 *Rhodococcus rhodochrous* P-11-123-1 (工業技術院生命工学工業技術研究所 寄託番号 FERM P-14193) が挙げられる。なお、この微生物 *Rhodococcus rhodochrous* P-11-123-1 は、上記の寄託番号 FERM P-14193 で通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、また、該菌株の菌学的性質は表1に示すとおりである。

【0008】

【表1】

菌学的性質

グラム染色性	+
胞子	-
運動性	-
形状	桿菌
コロニーの形状	ピンクオレンジ、不透明、円形、規則性、凸状、直径 0.5mm以下 (3日間培養)
各温度での生育	37℃ + 45℃ (+)
カタラーゼ	+
オキシダーゼ	-
OFテスト	-

【0009】細胞の化学分析

ミコール酸を含む。細胞壁のジアミノ酸はメソ-DAPである。脂肪酸成分は、16:0, 16:1, 18:1, 10-Me-18:0及び微量の14:0, 15:0, 17:0から成っている。

【0010】生化学テスト

分解	
アデニン	+
チロシン	+
尿素	-
単一炭素源での生育	
イノシトール ¹	-
マルトース ¹	(+)
マンニトール ¹	+
ラムノース ¹	-
ソルビトール ¹	+
m-ヒドロキシ安息香酸 ²	+
アジピン酸塩 ²	+
安息香酸塩 ²	+
クエン酸塩 ²	+
乳酸塩 ²	+
グルタミン酸塩 ²	-
L-チロシン ²	+
グリセロール ¹	(+)
トレハロース ¹	(+)
p-ヒドロキシ安息香酸 ²	+
D-マンノース ¹	-
アセトアミド ²	+

D-ガラクトース¹

酵素活性

α-グルコシダーゼ	+
システインアリルアミダーゼ	-
バリンアリルアミダーゼ	-
生育テスト (存在下)	
5% NaCl	+
アジドナトリウム (0.02% w/v)	-

【0011】注：表中の肩表記する記号は、培地に対する添加濃度を示し、また、符号(+)は下記の水準を意味する。

【0012】1. 1 % (w/v)

2. 0.1 % (w/v)

(+) weak positive

【0013】本発明のプラスミドpNC903は、具体的には上記微生物 *Rhodococcus rhodochrous* P-11-123-1 から、次に示す方法により分離することができる。

【0014】ノカルディオフォルム細菌は、通常の培地中で培養するとき、リゾチームなどの溶菌酵素で溶菌されにくいので、予めグリシン入り培地で当該微生物を培養し、ペニシリンGで処理することにより、溶菌酵素で溶菌され易い菌を得る。例えば、下記の組成のNBG培地にグリシンを1 % (w/v)程度添加した培地が用いられる。

(NBG培地)

Nutrient Broth No.2 (Oxoid)	2. 5 % (w/v)
グルコース	1. 0 % (w/v)

当該微生物を30℃で対数増殖後期まで培養し、更にペニシリンG所定量を培地に添加し数時間培養を継続した後、溶菌酵素 (リゾチーム、アクロモバクターペプターゼ等) で溶菌する。得られる溶菌液より、環状プラスミドDNAは、公知の方法で分離することができる

(Biochimica. et Biophysica. Acta., 383, 457-463 (1975)を参照)。更に、分離された環状プラスミドDNAの集合から、アガロースゲル上で電気泳動することにより、分子量の異なる環状プラスミドDNAを分離し、目的の分子量を有する環状プラスミドDNAを単離することができる。なお、当該微生物 *Rhodococcus rhodochrous* P-11-123-1 は、環状プラスミドDNAとして、分子量が約2.4 kbの該プラスミドpNC903一種のみを有しており、容易に単離することができる。

【0015】分子量が約2.4 kbの環状プラスミドとして単離される当該プラスミドpNC903の有する種々の制限酵素に対する感受性を調べると、その感受性は表2に示すものである。

【0016】

【表2】

プラスミドpNC903の制限酵素に対する感受性	
制限酵素	切断個所の数
EcoRI	0

	5
XbaI	0
KpnI	0
HindIII	0
BglII	0
SpeI	0
Clal	1
PstI	1
SphI	1
BamHI	1
AccI	1
SacI	1

【0017】なお、上記制限酵素は、それぞれ次の菌種から得られる制限酵素である。

制限酵素	菌種の名称
EcoRI	<u>Escherichia coli</u> RY13
XbaI	<u>Xanthomonas badrii</u> (ATCC 11672)
KpnI	<u>Klebsiella pneumoniae</u> OK8
HindIII	<u>Haemophilus influenzae</u> Rd
BglII	<u>Bacillus globigii</u>
SpeI	<u>Sphaerotilus natans</u> (ATCC 13923)
Clal	<u>Caryophanon latum</u> L
PstI	<u>Providencia stuartii</u> 1641 pPst101
SphI	<u>Streptomyces phaeochromogenes</u>
BamHI	<u>Bacillus subtilis</u> MT-2 (pBamHI RM22)
AccI	<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>
SacI	<u>Streptomyces achromogenes</u> (ATCC 12767)

【0018】各制限酵素による切断個所の数は、過剰量の制限酵素存在下にプラスミドpNC903を完全消化し、得られる消化物（切断されたDNA）を0.7%アガロースゲル電気泳動にかけ、分離可能なDNA断片の種類数から決定される。大腸菌のラムダファージのDNA（λ DNA）を制限酵素 HindIII で消化し得られる、既知分子量のDNA断片（J. Mol. Biol., 98, 551-564 (1975)）を参照）を同一のアガロースゲル上での電気泳動にかけ、その泳動距離で描かれる標準曲線に基づき、切断されたDNA断片の分子量は算出した。上記の制限酵素 C
lal、PstI、SphI、BamHI、AccI、又は SacI で完全消化し、得られる消化物（切断されたDNA）は、それぞれ約 2.4 kb の分子量を有する単一のDNA断片であった。更に、該プラスミドpNC903を、上記の制限酵素 C
lal、PstI、SphI、BamHI、AccI、SacI の2種以上を組み合わせて用いた処理によって得られる、複数のDNA断片の分子量をそれぞれアガロースゲル電気泳動で測定することにより、図1に示す制限酵素開裂地図を作成した。なお、互いに近接して存在する PstI と SphI の開裂位置は、アガロースゲル上での電気泳動による分子量の測定では容易に区別できないが、PstI と BamHI により切断される約 0.2 kb DNA断片中に SphI の切断部位が存在することを確認することで PstI と SphI の開裂位置の関係を特定した。また、本発明のプラスミドpN

C903は、その由来するノカルディオフォルム細菌（Rhodococcus rhodochrous P-11-123-1）中において複製が行え、ノカルディオフォルム細菌のDNA複製開始点（レプリコン）を内在している。

【0019】本発明のプラスミドpNC903は、図1に示す制限酵素による開裂部位を有しており、該開裂部位を利用して、該プラスミドを修飾して種々の有用なプラスミドベクターを開発することができる。更には、該プラスミド或はその修飾により得られる誘導体に、目的とする遺伝子のDNA断片、例えば、モノオキシゲナーゼ等の酵素或は蛋白質をコードする遺伝子のDNA断片を上記の制限酵素による開裂部位を利用して組み込み、得られる環状プラスミドを宿主微生物に導入して、宿主を形質転換させることが可能である。当該プラスミドpNC903を宿主ベクター系として適用できる宿主微生物として

は、該プラスミドpNC903が由来する Rhodococcus rhodochrous P-11-123-1 と類似するDNA鎖合成酵素（DNAポリメラーゼ）などプラスミドDNAの複製を司る酵素群を有するノカルディオフォルム細菌が好適に用いられる。なお、該プラスミドpNC903を宿主ベクター系として適用するに際しては、該プラスミドを汎用される選択マーカーの遺伝子、例えば、放線菌由来のチオストレプトン耐性遺伝子、大腸菌由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性をもたす遺伝子DNAにより修飾して、耐性遺伝子を内在したプラスミドベクターとして用いると好ましい。即ち、該プラスミドpNC903を修飾して得られる耐性遺伝子を内在したプラスミドベクターに目的の遺伝子のDNA断片を組み込み得られる環状プラスミドを作製し、この環状プラスミドを目的とする宿主微生物に導入して、前記の薬剤耐性を指標とし選別することで、容易に該環状プラスミドにより形質転換された微生物を選別することができる。

【0020】なお、上記の該プラスミドpNC903の耐性遺伝子による修飾、或はポリペプチドや蛋白質をコードする遺伝子などのDNA断片の組み込みは、公知の遺伝子DNA組み換え技術、例えば、参考文献 Scientific American 233(1) 24-33 (1975)、Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor (1982) などに記載されている手法を用いて行うことができ、目的とする環状プラスミドはその分子量を量り分取することができる。また、本発明のプラスミドpNC903、或は該プラスミドpNC903から上記のDNA組み換え技術により調製される環状プラスミドを宿主微生物に導入するには、例えば、宿主微生物であるノカルディオフォルム細菌の細胞をプロトプラスト或はスフェロプラストにして、環状プラスミドをポリエチレングリコール（PEG）と共存させることで環状プラスミドを移入する方法（J. Bacteriol. 170, 638-645 (1988)）などを参照）、または細胞を対数増殖期中期まで培養

し、高電圧の電気パルスを与えて環状プラスミドを移入するエレクトロポレーション法 (Appl. Environ. Microbio. 56, 2818-2825 (1990) など) を参照) 等の公知の技術を適用できる。

【0021】 更には、本発明のプラスミドpNC903をプラスミドベクターとして用い、目的とする酵素或は蛋白質をコードする遺伝子を組み込み得られる環状プラスミドを導入した宿主微生物の形質転換株は、それ自体を公知の方法で培養して、目的とする酵素或は蛋白質を産出させることができ、又目的とする酵素とその基質との反応による有用な代謝物の製造を行うことができる。即ち、目的とする酵素或は蛋白質を細胞外に分泌生産させたり、或は細胞内に生産蓄積させたりでき、更には生産させた酵素により、例えば、基質のオレフィンを酵素により酸化して、対応する光学活性なエポキシド類を生産するなどの酵素反応を行ったり、難分解物質を酵素反応により分解して代謝物に変換したりすることができる。

【0022】

【実施例1】

Rhodococcus rhodochrous P-11-123-1 からプラスミドpNC903の単離

Rhodococcus rhodochrous P-11-123-1 のスラントより3白金耳量を採取し、それを液体培地 [Nutrient Broth No.2(Oxoid) 2.5 % (w/v), グルコース 1 % (w/v), グリシン 1 % (w/v)] 500ml に接種し、30℃で21時間振盪培養した。この時点で、前記培養液中における濃度が0.5 units/ml となる量のペニシリンGを添加し、さらに30℃で3時間培養を継続した。次いで、培養した当該菌の菌体を該培養液から集菌し、TE緩衝液 [0.025M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、0.025M EDTA : pH8.0] で洗浄した。該菌体を、溶菌液 [0.3M ショ糖、0.025M トリス、0.025M EDTA、2 mg/ml リゾチーム、2 mg/ml アクロモペプチダーゼ、50 µg/ml RNase : pH8.0] 20ml 中に懸濁し、30℃で2時間反応させた。得られる反応液に、2% (w/v) ラウリル硫酸ナトリウムと0.3M 水酸化ナトリウムからなる溶液10mlを添加し、良く混合してから55℃の湯浴中に1時間置いた。この液に、フェノール・クロロホルム (1容:1容) 混合液4mlを加え、1分間良く混ぜ、液全体を白濁させた。

【0023】 この白濁した液を、4℃で30分間17000×gの遠心分離にかけ、得られる上層の溶液を分取した。再度、それと等量のフェノール・クロロホルム (1容:1容) 混合液を加え良く混ぜた後、4℃で30分間17000×gの遠心分離にかけ、分離した上層の溶液を分取した。

【0024】 この分取した上層の溶液に、それと等量のジエチルエーテルを加え、穏やかに攪拌した後しばらく放置した。分離する上層のジエチルエーテルを捨て、再度下層の溶液に、それと等量のジエチルエーテルを加え抽出した。前記のエーテル抽出後、得られる下層の液に、0.1倍容の3M 酢酸ナトリウム水溶液及び2倍容のエ

タノールを加え、析出した沈殿物を遠心分離で回収した。回収した沈殿物を5mlのTE緩衝液に溶解し、更に CsCl 7.5g と、1.5mg/ml 臭化エチジウム-TE緩衝液2ml とを加え混合し、溶液を得た。この溶液を42時間 120,000×gの密度勾配遠心分離にかけた。

【0025】 遠心分離したプラスミド画分を、紫外線照射により検出し、分取した。分取したプラスミド画分を、n-ブタノールで処理し臭化エチジウムを除いた。その後、TE緩衝液に対して透析し、エタノール沈殿により精製プラスミド画分を得た。該精製プラスミド画分を0.5 mlのTE緩衝液に溶解し、0.7%アガロースゲル電気泳動 (100 V、1時間) に供し、分子量 約 2.4 kb のプラスミドバンドの存在を確認した。該分子量 約 2.4kb のプラスミドバンドを含むゲル部分を分取した。このゲル部分を少量のTE緩衝液とともに透析膜に入れ、電気泳動させ、更に逆方向に短時間泳動させた後、透析膜内に残る溶液を回収し、この回収した溶液に、0.1倍容の3M 酢酸ナトリウム水溶液及び2倍容のエタノールを加え、析出した沈殿物を遠心分離で回収して、真空乾燥を行い、目的のプラスミドpNC903を得ることができる。なお、上記の精製プラスミド画分をアガロースゲル電気泳動に供し、分子量の異なるプラスミドを分離する際、前記分子量 約 2.4kb のプラスミドバンド以外のプラスミドバンドは見出されず、当該菌の有する環状プラスミドは、プラスミドpNC903のみであることが判る。

【0026】 また、プラスミドpNC903を、各種制限酵素によって単一消化、二重消化、或いは三重消化し、得られるDNA断片をアガロースゲル電気泳動にかけ、各DNA断片の移動度から分子量を求めたところ、プラスミドpNC903の分子量は約 2.4 kb であった。この場合、制限酵素の反応条件は、供給者によって定められた条件に従った。なお、分子量は、λ DNAを制限酵素 HindIII で分解して得られる断片の標準移動度のパターンを基にして決定した。更に、これらの結果から、該プラスミドpNC903は図1の制限酵素地図を示すことが分かった。また、アガロースゲル上での電気泳動による分子量の測定では容易に区別できない、互いに近接して存在する Pst I と Sph I の開裂位置は、Pst I と BamHIにより切断される約 0.2 kb DNA断片中に Sph I の切断部位が存在することを確認することで Pst I と Sph I の開裂位置の関係を特定した。

【0027】

【発明の効果】 本発明の環状プラスミドpNC903は、種々の制限酵素による開裂部位各一つを有しており、この特定される開裂部位を利用して、外来のDNA断片を導入修飾し、多くの有用なプラスミドベクターを開発することができる。更に、当該プラスミドは、ノカルディオフォルム細菌を宿主として、ノカルディオフォルム細菌中において複写が可能である、宿主-ベクター系におけるプラスミドベクターとして有用である。また、該プラス

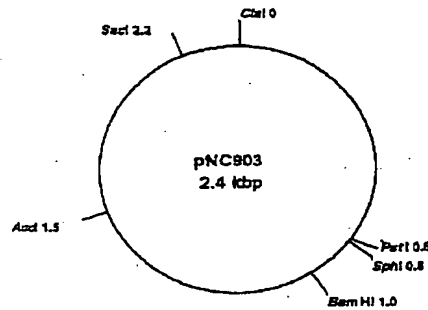
ミドを用いて、外来のDNA断片を導入修飾して得られる環状プラスミドベクターとし、更に得られる環状プラスミドベクターに種々の酵素或は蛋白質をコードする遺伝子を組み込み得られる環状プラスミドを導入した宿主微生物の形質転換株を利用し、該形質転換株を培養して目的の酵素或は蛋白質を産出させることができ、又目的

とする酵素とその基質との反応による有用な代謝物や酵素反応産物の製造を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 制限酵素 ClaI、PstI、SphI、BamHI、AccI、及びSacIによる切断部位の相対位置を示すプラスミドpNC903の制限酵素開裂地図。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C.1 2 R 1:01)